

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
田中 秀一	主査 教授 黒 岩 敏 彦 主査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 北 浦 泰 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 池 田 恒 彦
主論文題名 INHIBITION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 ACTIVITY BY TRANDOLAPRIL AFTER MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION IN RATS (ラット中大脳動脈閉塞モデルに対するトランドラプリルによるマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 抑制効果の検討)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>アンジオテンシン変換酵素(ACE)は、アンジオテンシン I をアンジオテンシン II (A II)に変換するプロテイナーゼの一つで、内皮細胞、マクロファージ等に発現している。A II は、血圧調整のみならず、サイトカイン等を介して組織リモデリングに重要な役割を担っている。これまでに、ラット中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルにおいて、梗塞脳半球で脳 ACE 活性が有意に上昇し、脂溶性 ACE 阻害薬であるトランドラプリルが脳 ACE 活性を抑制し、梗塞範囲を減少させると報告されているが、神経症状や生存率への影響、作用機序等の詳細については不明であった。</p> <p>マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) は、膜結合型のプロテイナーゼで、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン等の細胞外基質を分解する。細胞外基質は血管構造を支える基底膜を構成し、脳組織においては血液脳関門(BBB)として中枢神経系を保護する働きを担っている。脳虚血時には BBB が破綻して神経細胞死、脳浮腫をきたすが、この際、MMP-2,9 活性の上昇、細胞外基質の減少が報告されており、MMP-2,9 は脳損傷の病態機序に関与すると考えられる。ラット腎、ヒト心臓の抽出液で ACE 阻害薬が MMP-2,9 活性を抑制したとの報告があり、今回、MCAO モデルにおいて、BBB 透過性の脂溶性 ACE 阻害薬であるトランドラプリルによる、神経症状、生存率への影響と共に、その MMP 抑制効果を検討した。</p> <p>《方法》</p> <p>MCAO モデルは、体重 230-260g の正常血圧 Wister Kyoto rat(WKY)に糸付きシリコン塞栓子を内頸動脈から挿入して中大脳動脈起始部を閉塞する方法を用いた。トランドラプリルは MCAO 7 日前より 5mg/kg/day を混餌にて投与し、MCAO 後は投与中止し、MCAO 後 7 日目まで追跡した。同様のモデルでプラセボ群を対照に用い、以下の項目を検討した。</p> <p>(1) 血圧：収縮期血圧を tail-cuff method で測定(各群 n=6)</p> <p>(2) 神経症状：神経学的重症度スコアで評価(各群 n=12)</p> <p>(3) 脳 ACE 活性：脳半球抽出液と ACE 特異的合成基質(hippuryl-His-Leu)との反応で遊離する hippuric acid を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定(MCAO 後 12 時間、1 日、5 日、7 日で測定：各時点 n=6、2 群比較：各群 n=4~7)</p> <p>(4) 脳 MMP 活性：Gelatin zymography により gelatinolytic activity を測定(MCAO 前、MCAO 後 6 時</p>	

間、12時間、1日、5日、7日で測定：各時点 n=5、2群比較：各群 n=5)

(5) 脳梗塞範囲：MCAO 後 7 日目に、2,3,5-triphenylterazolium (TTC)染色で未染色部分を梗塞巣とし測定(各群 n=5)

(6) 生存率：MCAO 後 7 日目までの生存率を追跡(各群 n=35)

#### 《結果》

トランドラプリル群は、7 日間投与後に有意な血圧低下(約 20mmHg)を認め、投薬終了後 7 日目まで持続した。また、トランドラプリル群では MCAO 後 1~7 日にかけて有意に神経症状スコアが改善し、MCAO 後 7 日目での非梗塞半球に対する梗塞範囲の割合はトランドラプリル群 30.9±2.9%、プラセボ群 55.4±2.1%であり、トランドラプリル群で有意に抑制されていた。MCAO 後 7 日目までの生存率はトランドラプリル群 94.3%、プラセボ群 77.1%であり、トランドラプリル群で有意に改善していた。

プラセボ群での梗塞脳半球の ACE 活性は、MCAO 後 1 日目では非梗塞側と有意差なく、5~7 日目で有意に上昇し、7 日目で最大(非梗塞側の 1.92 倍)となった。トランドラプリル群では、両側脳半球で ACE 活性が MCAO 後 1~7 日目まで有意に抑制されていた(MCAO 後 7 日目に、梗塞側で 38.7%まで抑制)。

プラセボ群での梗塞脳半球の MMP 活性は、MMP-9 活性が MCAO 後 12 時間で有意に上昇し、1 日目で最大となり(MCAO 前の 2.24 倍)、また、MMP-2 活性は MCAO 後 1 日目で有意に上昇し、5 日目で最大となった(MCAO 前の 3.39 倍)。一方、トランドラプリル群では、MCAO 後 1 日目で MMP-2,9 活性とも有意に抑制されていた(MMP-9 活性で 68.5%、MMP-2 活性で 53.2%まで抑制)。

#### 《考察》

トランドラプリルは投薬終了後 7 日目においても持続的に脳 ACE 活性を抑制し、この時点での脳梗塞範囲、神経症状、生存率を改善せしめた。水溶性 ACE 阻害薬にはこうした効果は報告されておらず、脂溶性 ACE 阻害薬であるトランドラプリルが、BBB を通過し、高い組織親和性により脳保護に有利に働いたと思われる。

A II は、MMP-2,9 を誘導するとされるが、MCAO 後 1 日目で A II 産生酵素である脳 ACE 活性の変化が無いにもかかわらず、MMP-2,9 活性が上昇する事実は、トランドラプリルによる MCAO 後 1 日目の MMP-2,9 活性抑制は、A II を介さない直接的阻害作用の可能性を示している。また、過去の報告では、脳保護効果は MMP-9 活性抑制の結果とされており、MMP-2 の役割は不明である。従って、トランドラプリルの脳保護効果も MMP-9 活性抑制によるものが主ではないかと考える。

ARB(angiotensin II receptor blocker)がラット、マウスの MCAO モデルにおいて神経症状、脳梗塞範囲を改善させたとする報告では、ARB により AT1 receptor に対して拮抗された A II が AT2 receptor を刺激することが脳保護の主な作用とされており、同じ A II 作用抑制剤である ACE 阻害薬は、ARB と異なる機序で脳保護に働く可能性が示された。

今回の研究で、BBB を通過し、組織親和性の高い ACE 阻害薬であるトランドラプリルが、MCAO モデルにおいて、梗塞範囲に加えて神経症状、死亡率を改善できる事実を新たに示した。この脳保護の作用機序として、ACE 阻害薬による MMP-9 活性の直接阻害作用が関与する可能性をはじめて示した。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	田中 秀一
論文審査担当者		主 査 教授 黒 岩 敏 彦 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 北 浦 泰 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 池 田 恒 彦	
主論文題名 INHIBITION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 ACTIVITY BY TRANDOLAPRIL AFTER MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION IN RATS (ラット中大脳動脈閉塞モデルに対するトランドラプリルによるマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 抑制効果の検討)			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究は、Wistar-Kyoto (WKY) ラットの中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルにおいて、血液脳関門 (BBB)透過性の脂溶性アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬であるトランドラプリルの脳保護効果を検討したものである。</p> <p>申請者は、トランドラプリル群とプラセボ群で、MCAO 後の血圧変化、神経症状、脳 ACE 活性、脳マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)-2,9 活性、脳梗塞範囲、生存率を比較検討している。</p> <p>その結果、トランドラプリルによる血圧および脳 ACE 活性の持続的抑制と、MCAO 後 1 日目での MMP-2,9 活性の抑制、更に、7 日目までの神経症状、脳梗塞範囲、生存率の改善効果を示している。水溶性 ACE 阻害薬には同様の効果は報告されていない。また、プラセボ群において、脳 ACE 活性が MCAO 後 5~7 日目で上昇し、脳 MMP-2,9 活性が 1 日目で上昇する事実から、トランドラプリルの MMP-2,9 活性抑制がアンジオテンシン II を介さない直接的阻害作用の可能性を示している。過去の報告では、脳保護効果は、MMP-2 活性よりも MMP-9 活性抑制の結果とされていることから、トランドラプリルの脳保護効果は MMP-9 活性抑制によるものが主と考えている。</p> <p>本研究は、トランドラプリルが、BBB を通過し、組織親和性の高い ACE 阻害薬であることが脳保護に有利に働くことを示し、この脳保護効果の作用機序には MMP-9 活性の直接的阻害作用が関与する可能性をはじめ示しており、今後の脳卒中治療の研究に重要な知見を与えるものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Hypertension Research 30: 000-000, 2007 (in press)</p>			